昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, September 2007, 50(9):883 - 888　　ISSN 0454-6296

光滑鳖甲热休克蛋白 70 基因的克隆及表达

陈 亮,张富春,黄 萍,马 纪*

(新疆大学生命科学与技术学院,新疆生物资源基因工程重点实验室,乌鲁木齐 830046)

摘要:根据 GenBank 中发表的昆虫热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)基因的保守序列设计引物,利用 PCR 结合 RACE 扩增的方法,获得新疆荒漠昆虫光滑鳖甲 *Anatolica polita borealis* 热休克蛋白 70 基因,命名为 *APhsp*70(GenBank 注册号为 EF569673)。测序结果表明,序列长为 2 092 bp,由核酸序列推演出的蛋白质分子量为 70 kD,含 653 个氨基酸残基。基因结构分析表明 *APhsp*70 不含内含子序列。通过 Northern blotting 和半定量 RT-PCR 技术研究昆虫在受到不同温度胁迫时该基因的表达规律,结果表明:在 45℃处理时,昆虫体内该基因的表达水平显著上升。并且,当机体受到 -5℃低温胁迫并在室温恢复 15 min 后 *APhsp*70 的表达量也显著升高;但是 4℃和 -10℃低温处理组 *APhsp*70 的表达未见明显变化。

关键词:光滑鳖甲;热休克蛋白 70;克隆;表达分析;温度胁迫;半定量 RT-PCR

中图分类号:Q966　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0454-6296(2007)09-0883-06

Cloning and expression analysis of heat shock protein 70 gene from *Anatolica polita borealis* (Coleoptera: Tenebrionidae)

CHEN Liang, ZHANG Fu-Chun, HUANG Ping, MA Ji* (Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: The heat shock protein 70 gene (*hsp*70) from *Anatolica polita borealis* (a desert beetle distributed in Xinjiang) was isolated through PCR and RT-PCR technique. Sequence analysis indicated that the *APhsp*70 gene (GenBank accession no. EF569673) has 2 092 bp in length, includes one full open reading fragment and potentially encodes a 653 amino acid residuum protein. The protein deduced from the isolated gene had a calculated molecular mass of 70 kD and was therefore named APHSP70. The *APhsp*70 gene contains no intron. The expression pattern of *APhsp*70 was examined at the transcription level after treatment with heat and cold stress. The Northern blot and semi-quantitative RT-PCR results revealed that the *APhsp*70 was an inducible 70 kDa isoform whose expression was specifically induced by the different stress factors.

Key words: *Anatolica polita borealis*; HSP70; cloning; expression analysis; temperature stress; semi-quantitative RT-PCR

自从 Ritossa 在果蝇体内发现热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)以来,陆续报道证明,几乎所有生物细胞(包括原核细胞和真核细胞)在温度升高时均可合成热休克蛋白(张永强等,2004;黄惠芳和马飞,2004)。不仅如此,其他一些因素,如低温、氧自由基、缺血缺氧、氨基酸类似物、重金属盐等胁迫条件,同样可以诱导此类蛋白质的产生,故又称这类蛋白质为应激蛋白(stress proteins, SP)(Piano *et al*., 2005)。在胁迫条件下,HSP 能够防止蛋白质变性和帮助已变性的蛋白重新折叠,恢复正确的构象,对于细胞的生存起着至关重要的作用(Landais *et al*., 2001)。

昆虫热休克蛋白按同源性及分子量大小可分为 5 个主要家族:HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和小分子量热休克蛋白(Nover and Scharf, 1997)。其中 HSP70 是最保守、最重要的,也是研究最深入的一族,包括 68、72、73 kD 等多种蛋白(李冰祥等,1997)。在正常条件下,HSP70 主要参与新生肽链的折叠和

基金项目:科技部重大基础研究前期研究专项(2003CCA01000);新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题(XJDX0201-200403)

作者简介:陈亮,男,1977 年生,新疆博乐人,硕士研究生,专业为动物学,E-mail:adcchen@126.com

* **通讯作者** Author for correspondence, E-mail: majiuci@xju.edu.cn

收稿日期 Received: 2007-02-26;**接受日期** Accepted: 2007-05-14

组装过程，以及细胞内蛋白质跨膜转运过程（Deane and Woo，2005）。而在胁迫条件下，诱导 HSP70 表达量升高的直接原因是细胞内出现变性蛋白（Deane and Woo，2005），HSP70 作为一种非特异性保护蛋白，可以帮助变性的蛋白质恢复正确构象。

光滑鳖甲 *Anatolica polita borealis* 属于鞘翅目拟步甲科昆虫，是分布于新疆荒漠环境中一种代表性的昆虫（黄人鑫等，2005）。新疆地处欧亚大陆腹地，荒漠昼夜温差和季节温差较大。生存环境中一些自然因素的突然改变将影响机体的正常生长代谢（Issartel *et al*.，2005），表现为代谢酶类活性降低，蛋白质三维构象改变，细胞平衡受到破坏，甚至可能引起死亡（Carpenter and Crowe，1988）。因此，从极端环境中生物本身的适应机制入手，筛选并克隆一些与抗逆密切相关的基因，研究这些基因的表达调控规律，有助于探讨如何提高生物的抗逆能力，进而来提高生物适应不良环境的能力。

1 材料与方法

1.1 试虫

光滑鳖甲采自新疆五家渠市 103 团古尔班通古特沙漠边缘地带。采集后在室内进行短期饲养，室温，自然光周期，喂食其生境植物及枯落物等。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、反转录酶及各种限制性内切酶、5′-Full RACE Core Set、pMD18-T 载体、核酸回收试剂盒等购自宝生物工程（大连）有限公司；UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒为上海生工生物工程技术服务公司产品；DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 为 Roche 公司产品；带正电荷尼龙膜为 Millipore 公司产品；大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存；其余所用的化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 基因组 DNA 的提取和总 RNA 的分离

用 2×CTAB（十六烷基三乙基溴化铵）法提取昆虫基因组 DNA。取光滑鳖甲 1 只，加液氮研磨后加入 500 μL 2×CTAB 提取液（NaCl 1.4 mol/L；Tris-HCl 100 mmol/L；EDTA 20 mmol/L；CTAB 质量分数 2%；聚乙烯吡咯烷酮 1%）和 10 μL 蛋白酶 K（20 mg/mL），60℃水浴 2 h；加入等体积的氯仿/异戊醇（24∶1），振荡混匀，12 000 r/min室温离心 15 min，吸取上清液后加入等体积异丙醇，-20℃放置 1 h；12 000 r/min 4℃离心 15 min，70%乙醇洗涤晾干后 TE 溶解。用 0.7%的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定基因组 DNA 的浓度和纯度。

总 RNA 的提取按照 UNIQ-10 柱式总 RNA 提取试剂盒操作说明进行，用 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外/可见分光光度计（NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer）测定总 RNA 的浓度和纯度。

1.4 光滑鳖甲热休克蛋白 70 基因（*APhsp*70）核心片段的克隆

根据 GenBank 上发表的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 热休克蛋白 70 基因序列设计引物，扩增 *APhsp*70 基因的核心片段。上游引物 Hsp70F：5′-CGCTGCTATCGCTTACGG-3′，下游引物 Hsp70R：5′-TTAATCAACTTCCTCGATAGTGGG-3′。反应条件：94℃ 5 min；94℃ 30 s，50℃ 30 s，72℃ 2 min，35 个循环；72℃ 7 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果，切胶回收目的片段后连接到 pMD18-T 载体上，送上海生物工程公司进行测序。

1.5 5′-RACE 反应

按照 5′-Full RACE Core Set 操作说明，用 Primer 5 软件在 *APhsp*70 核心片段的上游设计 5′-RACE 反应用引物，扩增 *APhsp*70 的 5′非翻译区，所用引物序列如下：

Aphsp70S1：5′-GAAGATCCAGGTCGAGTACAAAGG-3′
Aphsp70A1：5′-CTGGTTCTTCGCAGCGTCTC-3′
Aphsp70S2：5′-GTTGACGAAAATGAAAGAAACCGC-3′
Aphsp70A2：5′-CTGGGTGTCGTTCTGTTACCTTG-3′
Aphsp70RT：5′-CGTTGAAGTAGGC-3′（5′端磷酸化）

1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果，目的条带经胶回收纯化后连接到 pMD18-T 载体上，送上海生物工程公司进行测序。

1.6 不同温度处理后 *APhsp*70 的表达

1.6.1 高温处理：将室内短期饲养的光滑鳖甲成虫在 GNP-9080 型隔水式恒温培养箱 45℃分别处理 5、10、15、20 min 后立即提取总 RNA，Northern blotting 检测 *APhsp*70 的表达水平。

1.6.2 光滑鳖甲产生热激响应时间的测定：将室内短期饲养的光滑鳖甲成虫在 45℃分别处理 0.5、1、2、5 min，然后在室温下恢复 15 min，立即提取总 RNA，Northern blot 检测 *APhsp*70 的表达水平。

1.6.3 低温处理：将室内短期饲养的光滑鳖甲成虫分为 3 组，用 LTI-700 型（EYELA 公司）恒温恒湿培养箱分别在 4℃、-5℃、-10℃处理 10 min，然后室温恢复 15 min 后提取总 RNA，半定量 RT-PCR 检测 *APhsp*70 的表达水平。

1.7 Northern blotting

以克隆的*APhsp*70核心片段为模板，按照DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I操作说明进行探针标记。分别取30 μg不同温度处理以及未处理的昆虫总RNA进行Northern blotting分析。经1.2%甲醛变性凝胶40 V电压电泳4 h后，10×SSC转移缓冲液，下行毛细管转移法转膜4 h。随后操作均按照试剂盒操作说明进行。

1.8 半定量RT-PCR

取1.5 μg总RNA进行RT-PCR，反转录用Oligo(dT)$_{18}$作下游引物，反应条件：42℃ 45 min，95℃ 5 min，5℃ 5 min。取1 μL第1链cDNA为模板，以*β-actin*为内标，上游引物：5′-GCGACTTGACCGACTACCT-3′，下游引物：5′-CCGCACGATTCCATACCC-3′，反应条件：94℃ 5 min；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 30 s，25个循环；72℃ 7 min。*APhsp*70半定量PCR上游引物：5′-CAATCAGCCAGCCGTCACCA-3′，下游引物：5′-CACCTCCGTATTTCTGTCCT-3′，反应条件：94℃ 5 min；94℃ 30 s，50℃ 30 s，72℃ 30 s，30个循环；72℃ 7 min。反应产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测。用Alpha公司的凝胶成像系统（Alpha Imager，2200 Documentation & Analysis System）记录结果并扫描电泳条带的IDV（integrated density value）值，计算每个样品*APhsp*70与*β-actin* IDV的比值，统计学分析不同处理组之间*APhsp*70的表达水平差异。

2 结果与分析

2.1 *APhsp*70基因的克隆与序列分析

使用Hsp70F和Hsp70R这对引物以基因组DNA为模板，进行PCR扩增得到预期大小的一段核心片段，测序结果表明该片段长1 951 bp。由于下游引物位于hsp70的3′末端，包含终止密码子和编码氨基酸保守性非常高的EEVD的核酸序列（Freeman *et al*.，1995），因而人为获得该基因的3′末端。通过5′-RACE反应得到一段226 bp大小的核酸片段，与核心片段拼接得到一个长2 092 bp序列，命名为*APhsp*70。将其在GenBank中注册，登录号为EF569673。其完整的开放阅读框长为1 962 bp，由核酸序列推演出的蛋白质含653个氨基酸残基，分子量约为70 kD。

GenBank中检索结果表明HSP70在进化过程中十分保守，与其他真核生物的HSP70家族成员有很高的同源性。其中与赤拟谷盗*Tribolium castaneum*（GenBank登录号XP974442）、美洲斑潜蝇*Liriomyza sativae*（GenBank登录号AAW32099）、黑腹果蝇*Drosophila melanogaster*（GenBank登录号NP524474）的HSP70氨基酸同源性分别为94.18%、80.25%和78.87%（图1）。氨基酸序列分析显示，光滑鳖甲HSP70含有Dnak特征基序DLGTT-S-V（10－18残基）、胞质HSP70特征基序EEVD（650－653残基）以及靠近C端的GGMP 4肽序列（622－625残基），整个分子的氨基端保守性较高，羧基端保守性较低。

2.2 高温条件下*APhsp*70的表达情况

Northern blotting分析光滑鳖甲45℃热处理不同时间*APhsp*70的表达水平，结果表明：高温可以诱导*APhsp*70的表达。并且持续高温处理15 min时，通过Northern blotting技术检测到*APhsp*70的表达量明显增高（图2：A）。热激响应时间的实验中热处理30 s、1 min和2 min，在室温恢复15 min后没有检测到*APhsp*70的表达量有明显的改变 热处理5 min之后在室温恢复15 min，*APhsp*70表达显著增强（图2：B）。

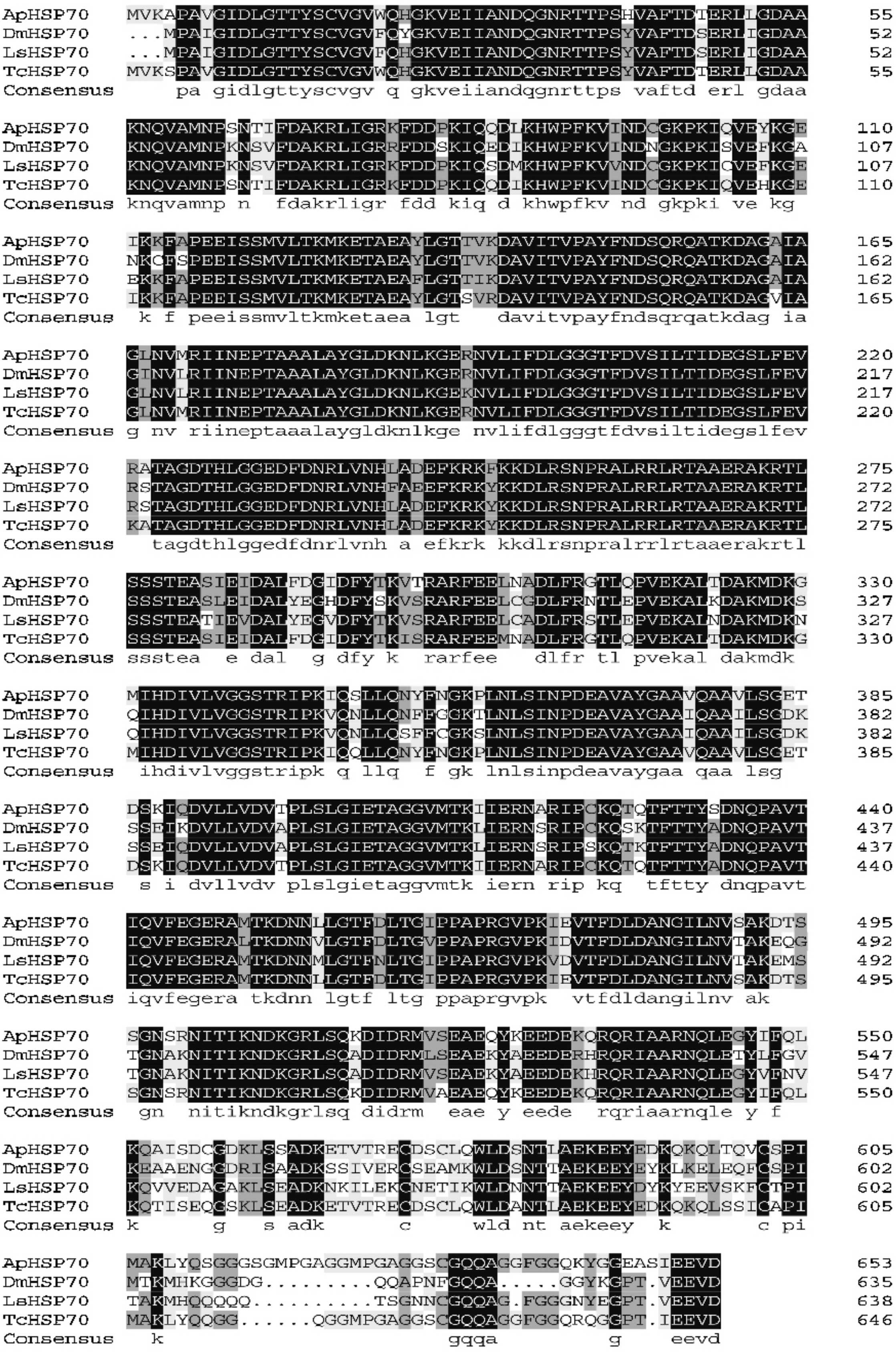
2.3 低温条件下*APhsp*70的表达情况

用4℃低温处理光滑鳖甲15 min后立即取样，并在室温恢复的15、30 min取样，检测4℃处理时光滑鳖甲体内*APhsp*70表达水平变化。半定量RT-PCR结果表明，4℃低温处理光滑鳖甲15 min以及随后室温恢复过程中*APhsp*70表达水平没有明显的变化。进一步降低温度，用－5℃和－10℃处理光滑鳖甲，结果显示：－5℃处理组与对照组相比*APhsp*70的表达量显著升高（$P < 0.05$）。－10℃处理组与对照组相比没有明显的变化（图3）。

3 讨论

热休克蛋白70家族包括诱导型HSP70和组成型HSP70，大部分诱导型*hsp*70不含内含子，转录后不需要经过剪接加工，在应激状态下可优先表达*hsp*70，起着保护机体的分子伴侣作用（Demand *et al*.，1998；Rezaie *et al*.，2000）。本研究克隆的*APhsp*70基因结构分析表明，与已报道的其他物种的*hsp*70一样没有内含子序列。氨基酸序列分析显示，克隆的光滑鳖甲HSP70含有Dnak的特征基序DLGTT-S-V、胞质HSP70特征基序EEVD，以及靠近C端的GGMP 4肽序列，说明本研究成功克隆了光滑鳖甲HSP70家族成员基因。

HSP70氨基酸序列在不同的物种中有很强的同源性，在进化过程中高度保守（李冰祥等，1997）。在HSP70 N端为40 kD的ATP酶结构域，其后为18 kD



```
ApHSP70    MVKAPAVGIDLGTTYSCVGVWQHGKVEIIANDQGNRTTPSHVAFTDTERLIGDAA   55
DmHSP70    ...MPAIGIDLGTTYSCVGVFQYGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDSERLIGDAA   52
LsHSP70    ...MPAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDSERLIGDAA   52
TcHSP70    MVKSPAVGIDLGTTYSCVGVWQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAA   55
Consensus      pa gidlgttyscvgv q gkveiiandqgnrttps vaftd erl gdaa

ApHSP70    KNQVAMNPSNTIFDAKRLIGRKFDDPKIQQDLKHWPFKVINDCGKPKIQVEYKGE  110
DmHSP70    KNQVAMNPKNSVFDAKRLIGRRFDDSKIQEDIKHWPFKVINDNGKPKISVEFKGA  107
LsHSP70    KNQVAMNPKNSVFDAKRLIGRKFDDPKIQSDMKHWPFKVVNDCGKPKIQVEFKGE  107
TcHSP70    KNQVAMNPSNTIFDAKRLIGRKFDDPKIQQDIKHWPFKVINDCGKPKIQVEHKGE  110
Consensus  knqvamnp n  fdakrligr fdd kiq d khwpfkv nd gkpki ve kg

ApHSP70    IKKFAPEEISSMVLTKMKETAEAYLGTTVKDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGAIA  165
DmHSP70    NKCFSPEEISSMVLTKMKETAEAYLGTTVKDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGAIA  162
LsHSP70    EKKFAPEEISSMVLTKMKETAEAFLGTTIKDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGAIA  162
TcHSP70    IKKFAPEEISSMVLTKMKETAEAYLGTSVRDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIA  165
Consensus   k f peeissmvltkmketaea lgt   davitvpayfndsqrqatkdag ia

ApHSP70    GLNVMRIINEPTAAALAYGLDKNLKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDEGSLFEV  220
DmHSP70    GINVLRIINEPTAAALAYGLDKNLKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDEGSLFEV  217
LsHSP70    GLNVLRIINEPTAAALAYGLDKNLKGEKNVLIFDLGGGTFDVSILTIDEGSLFEV  217
TcHSP70    GLNVMRIINEPTAAALAYGLDKNLKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDEGSLFEV  220
Consensus  g nv riineptaaalaygldknlkge nvlifdlgggtfdvsiltidegslfev

ApHSP70    RATAGDTHLGGEDFDNRLVNHLADEFKRKFKKDLRSNPRALRRLRTAAERAKRTL  275
DmHSP70    RSTAGDTHLGGEDFDNRLVNHFAEEFKRKYKKDLRSNPRALRRLRTAAERAKRTL  272
LsHSP70    RSTAGDTHLGGEDFDNRLVNHLADEFKRKYKKDLRSNPRALRRLRTAAERAKRTL  272
TcHSP70    KATAGDTHLGGEDFDNRLVNHLADEFKRKYKKDLRSNPRALRRLRTAAERAKRTL  275
Consensus    tagdthlggedfdnrlvnh a efkrk kkdlrsnpralrrlrtaaerakrtl

ApHSP70    SSSTEASIEIDALFDGIDFYTKVTRARFEELNADLFRGTLQPVEKALTDAKMDKG  330
DmHSP70    SSSTEASLEIDALYEGHDFYSKVSRARFEELCGDLFRNTLEPVEKALKDAKMDKS  327
LsHSP70    SSSTEATIEVDALYEGVDFYTKVSRARFEELCADLFRSTLEPVEKALNDAKMDKN  327
TcHSP70    SSSTEASIEIDALFDGIDFYTKISRARFEEMNADLFRGTLQPVEKALTDAKMDKG  330
Consensus  ssstea  e dal  g dfy k  rarfee   dlfr tl pvekal dakmdk

ApHSP70    MIHDIVLVGGSTRIPKIQSLLQNYFNGKPLNLSINPDEAVAYGAAVQAAVLSGET  385
DmHSP70    QIHDIVLVGGSTRIPKVQNLLQNFFGGKTLNLSINPDEAVAYGAAIQAAILSGDK  382
LsHSP70    QIHDIVLVGGSTRIPKVQNLLQSFFCGKSLNLSINPDEAVAYGAAIQAAILSGDK  382
TcHSP70    MIHDIVLVGGSTRIPKIQQLLQNYFNGKPLNLSINPDEAVAYGAAVQAAVLSGET  385
Consensus   ihdivlvggstripk q llq  f gk lnlsinpdeavaygaa qaa lsg

ApHSP70    DSKIQDVLLVDVTPLSLGIETAGGVMTKIIERNARIPCKQTQTFTTYSDNQPAVT  440
DmHSP70    SSEIKDVLLVDVAPLSLGIETAGGVMTKLIERNSRIPCKQSKTFTTYADNQPAVT  437
LsHSP70    SSEIQDVLLVDVAPLSLGIETAGGVMTKLIERNSRIPSKQTKTFTTYADNQPAVT  437
TcHSP70    DSKIQDVLLVDVTPLSLGIETAGGVMTKIIERNARIPCKQTQTFTTYADNQPAVT  440
Consensus   s i dvllvdv plslgietaggvmtk iern rip kq  tftty dnqpavt

ApHSP70    IQVFEGERAMTKDNNLLGTFDLTGIPPAPRGVPKIEVTFDLDANGILNVSAKDTS  495
DmHSP70    IQVFEGERALTKDNNVLGTFDLTGVPPAPRGVPKIDVTFDLDANGILNVTAKEQG  492
LsHSP70    IQVFEGERAMTKDNNMLGTFNLTGIPPAPRGVPKVDVTFDLDANGILNVTAKEMS  492
TcHSP70    IQVFEGERAMTKDNNLLGTFDLTGIPPAPRGVPKIEVTFDLDANGILNVSAKDTS  495
Consensus  iqvfegera tkdnn lgtf ltg ppaprgvpk  vtfdldangilnv ak

ApHSP70    SGNSRNITIKNDKGRLSQKDIDRMVSEAEQYKEEDEKQRQRIAARNQLEGYIFQL  550
DmHSP70    TGNAKNITIKNDKGRLSQADIDRMLSEAEKYAEEDERHRQRIAARNQLETYLFGV  547
LsHSP70    TGNAKNITIKNDKGRLSQADIDRMVSEAEKYAEEDEKHRQRIAARNQLEGYVFNV  547
TcHSP70    SGNSRNITIKNDKGRLSQKDIDRMVAEAEQYKEEDEKQRQRIAARNQLEGYIFQL  550
Consensus   gn  nitikndkgrlsq didrm  eae y eede  rqriaarnqle y f

ApHSP70    KQAISDCGDKLSSADKETVTRECDSCLQWLDSNTLAEKEEYEDKQKQLTQVCSPI  605
DmHSP70    KEAAENGGDRISAADKSSIVERCSEAMKWLDSNTTAEKEEYEYKLKELEQFCSPI  602
LsHSP70    KQVVEDAGAKLSEADKNKILEKCNETIKWLDNNTTAEKEEYDYKYEEVSKFCTPI  602
TcHSP70    KQTISEQGSKLSEADKETVTRECDSCLQWLDANTLAEKEEYEDKQKQLSSICAPI  605
Consensus  k      g   s adk      c     wld nt aekeey  k       c pi

ApHSP70    MAKLYQSGGGSGMPGAGGMPGAGGSCGQQAGGFGGQKYGGEASIEEVD         653
DmHSP70    MTKMHKGGGDG.........QQAPNFGQQA.....GGYKGPT.VEEVD         635
LsHSP70    TAKMHQQQQQ..........TSGNNCGQQAG.FGGGNYEGPT.VEEVD         638
TcHSP70    MAKLYQQGG......QGGMPGAGGSCGQQAGGFGGQRQGGPT.IEEVD         646
Consensus    k                       gqqa         g    eevd
```

图 1　4 种昆虫 HSP70 氨基酸同源性比较

Fig. 1　Alignments of the amino acid similarity of HSP70 from four insects

ApHSP70：**光滑鳖甲** *Anatolica polita borealis*；DmHSP70：**黑腹果蝇** *Drosophila melanogaster*；LsHSP70：**美洲斑潜蝇** *Liriomyza sativae*；TcHSP70：**赤拟谷盗** *Tribolium castaneum*.

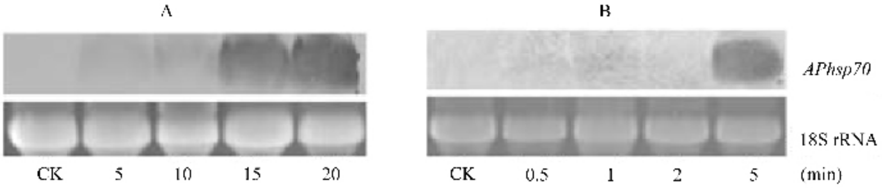


图2　Northern blotting 分析热处理不同时间 *APhsp*70 的表达水平差异

Fig. 2　The expression level of *APhsp*70 in beetles after treatment at 45℃ for different time detected by Northern blotting

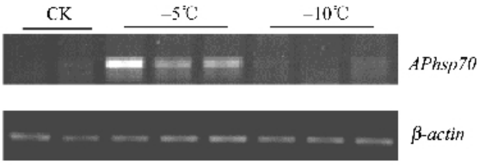


图3　－5℃、－10℃分别处理10 min随后室温恢复10 min，光滑鳖甲体内 *APhsp*70 的表达情况

Fig. 3　The expression levels of *APhsp*70 in beetles recovering at room temperature for 10 min after treatment at －5℃ or －10℃ for 10 min

的底物结合结构域，C端约10 kD区域为C端结构域（焦传珍等，2004）。本研究克隆的光滑鳖甲HSP70与同科昆虫赤拟谷盗HSP70氨基酸同源性达到94.18%。与其他物种比对结果表明，ATP酶结构域和底物结合结构域在所有的物种中都十分保守，但是C端结构域保守性较低。造成C端结构域在进化过程中产生较大变异的原因，需要结合C端结构域的功能进一步研究。

采用半定量RT-PCR技术研究光滑鳖甲体内 *APhsp*70 的表达规律时，发现正常条件下，光滑鳖甲体内 *APhsp*70 有少量的表达；然而采用Northern blotting技术，对照组中没有检测到 *APhsp*70 的表达，这与两种实验技术的灵敏度和保守性有关。由于HSP70在正常情况下的表达有助于新生肽链的正确折叠以及在细胞内的转运，在细胞的正常生理过程中起分子伴侣的作用（Hendrick and Hartl，1995）。Northern blotting结果表明光滑鳖甲经过高温（45℃）处理后，其 *APhsp*70 基因的表达明显增强。而HSP70在体内的积累有利于提高机体的耐热能力，从而可以使其耐受更高的温度（王海鸿和雷仲仁，2005）。在果蝇的实验中得出同样的结论：热休克蛋白的积累可以提高果蝇对随后致死高温的耐受能力（陈小芬和杨玉荣，2005）。有资料表明果蝇在致死高温下不表达 *hsp*，仅在修复期间才表达（Liu *et al*.，1994）。本实验采用45℃长时间处理昆虫，*APhsp*70 的表达持续增高，所以推测本实验所用45℃对光滑鳖甲来说不是致死温度，并且这个温度也与其生境夏季午间的地面温度相吻合。

有文献表明热休克蛋白也可由冷休克诱导，冷休克是指迅速而短暂地暴露在低而非结冰温度所造成的应激损伤（李冰祥等，1997）。不同低温处理光滑鳖甲，*APhsp*70 的表达水平各不相同。这可能是由于不同低温对机体细胞造成的影响不同。4℃低温处理昆虫，实验组和对照组之间 *APhsp*70 的表达无显著差异。推测4℃低温相对比较温和，没有引起细胞内的蛋白变性；－5℃处理组，*APhsp*70 的表达水平显著高于对照组和－10℃处理组。本实验室测得夏季光滑鳖甲的冰点在－8℃，由此推测，－5℃可能引起了昆虫的冷休克反应，而－10℃低于冰点温度，所引起的反应可能不属于冷休克反应，这一部分研究未见更多报道。

在冷、热胁迫下，机体内最明显的生理变化之一是热休克蛋白（HSPs）的表达量升高。HSPs与多种蛋白之间的相互作用不仅有助于维持逆境下这些蛋白的折叠能力和保持其正确的折叠状态，还能协助降解体内错误折叠或变性蛋白，从而避免细胞受损伤。作为生物体在各种胁迫条件下诱导合成的热休克蛋白（HSPs）是当今生物抗逆生理学的一个重要研究内容，本研究初步开展了新疆荒漠昆虫不同温度胁迫时 *hsp* 基因的表达规律，为深入开展新疆荒漠昆虫抗逆适应性机制研究奠定了理论基础。

参考文献（References）

Carpenter JF，Crowe JH，1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*，25(3)：24－55.

Chen XF，Yang YR，2005. Effects of cold- and heat-hardening on resistance to temperature extremes in *Drosophila melanogaster*. *J. Xiamen Univ*. (*Natural Science Edition*)，44：186－190.［陈小芬，杨玉荣，2005. 果蝇对冷、热极限温度耐受能力的研究. 厦门大学学报（自然科学版），44：186－190］

Deane EE，Woo NY，2005. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream：Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*.，330(3)：776－783.

Demand J，Luders J，Hohfeld J，1998. The carboxy-terminal domain of

Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol. Cell Biol.*，18(4)：2 023 – 2 028.

Freeman BC，Myers MP，Schumacher R，Morimoto RI，1995. Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity，substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J.*，14(10)：2 281 – 2 292.

Hendrick JP，Hartl FU，1995. The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB J.*，9(15)：1 559 – 1 569.

Huang HF，Ma F，2004. The molecular evolution of heat shock protein. *J. Xiamen Univ.* (*Natural Science Edition*)，43：166 – 170. [**黄惠芳，马飞**，2004. **热激蛋白的分子进化研究. 厦门大学学报(自然科学版)**，43：166 – 170]

Huang RX，Wu W，Mao XF，Hu HY，Fan ZT，Hou YJ，Li XP，Du CH，Shao HG，Huang X，Ouyang T，2005. The Fauna of the Desert Insects of Xinjiang and Formation and Evolution. Urumqi：Xinjiang Science and Technology Press. 37 – 47. [**黄人鑫，吴卫，毛新芳，胡红英，范兆田，侯艳君，李新平，杜春华，邵红光，黄翔，欧阳彤**，2005. **新疆荒漠昆虫区系及其形成与演变. 乌鲁木齐：新疆科技出版社**. 37 – 47]

Issartel J，Renault D，Voituron Y，Bouchereau A，Vernon P，Hervant F，2005. Metabolic responses to cold in subterranean crustaceans. *J. Exp. Biol.*，208：2 923 – 2 929.

Jiao CZ，Wang ZZ，Li FH，Zhang CS，Xiang JH，2004. Cloning，sequencing and expression analysis of cDNA encoding a constitutive heat shock protein 70 (HSC70) in *Fenneropenaeus chinensi*. *Chinese Sci. Bull.*，49(21)：2 178 – 2 186. [**焦传珍，王在照，李富花，张成松，相建海**，2004. **编码中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)一种组成型热休克蛋白** 70 (HSC70)**的** cDNA **克隆、测序及其表达分析. 科学通报**，49(21)：2 178 – 2 186]

Landais I，Pommet J，Mita K，Nohata J，Gimenez S，Fournier P，Devauchelle G，Duonor-Cerutti M，Ogliastro M，2001. Characterization of the cDNA encoding the 90 kDa heat-shock protein in the Lepidoptera *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda*. *Gene*，271(2)：223 – 231.

Li BX，Cai HL，Chen YL，1997. Heat shock response and heat shock proteins of insects. *Acta Entomol. Sin.*，40(4)：417 – 427. [**李冰祥，蔡惠罗，陈永林**，1997. **昆虫的热休克反应和热休克蛋白. 昆虫学报**，40(4)：417 – 427]

Liu AY，Bian H，Huang LE，Lee YK，1994. Transient cold shock induces the heat shock response upon recovery at 37℃ in human cells. *J. Biol. Chem.*，269(20)：14 768 – 14 775.

Nover L，Scharf KD，1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol. Life Sci.*，53(1)：80 – 103.

Piano A，Franzellitti S，Tinti F，Fabbri E，2005. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster，*Ostrea edulis*. *Gene*，361：119 – 126.

Rezaie S，Ban J，Mildner M，Poitschek C，Brna C，Tschachler E，2000. Characterization of a cDNA clone，encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. *Gene*，241(1)：27 – 33.

Wang HH，Lei ZR，2005. Current developments of heat shock proteins in insects. *Scientia Agricultura Sinica*，38(10)：2 023 – 2 034. [**王海鸿，雷仲仁**，2005. **昆虫热休克蛋白的研究进展. 中国农业科学**，38(10)：2 023 – 2 034]

Zhang YQ，Wang JJ，Ding W，Zhao ZM，2004. Heat shock proteins in insects. *Entomological Knowledge*，40(1)：16 – 19. [**张永强，王进军，丁伟，赵志模**，2004. **昆虫热休克蛋白的研究概况. 昆虫知识**，40(1)：16 – 19]

(责任编辑：黄玲巧)